

## 効率的SNP分析技術の開発とそれを用いたイネの花 粉発達異常に関する遺伝学的研究

著者	汐海 沙知子
号	46
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第993号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/60153">http://hdl.handle.net/10097/60153</a>

しおかい さちこ

氏 名（本 籍 地） 汐 海 沙知子

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 993 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 22 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論 文 題 目 効率的 SNP 分析技術の開発とそれを用いたイネの花粉発達異常に関する遺伝学  
学的研究

博士論文審査委員 （主査）教 授 西 尾 剛

教 授 鳥 山 欽 哉

教 授 牧 野 周

# 論文内容要旨

## 緒言

収量やストレス耐性など農業上重要な形質の多くは量的形質であり、それらの遺伝子を単離するには多大なコストと労力がかかる。特に大量個体の遺伝子型判定を低コストで効率よく行う手法の開発は、迅速な遺伝子単離を目指す上で重要である。

イネの雄性生殖器官の正常な発達および成熟は、種子生産に直接的に関わるために非常に重要であるが、その機構には未解明な部分が多い。核型雄性不稔変異体を用いて、雄性不稔の原因となる変異をもつ遺伝子を特定することで、花粉発達機構解明の手がかりを得る事ができ、一代雑種育種への応用も期待できる。また、イネは穂ばらみ期と呼ばれる雄性生殖器官発達時に低温に遭遇すると雄性不稔となり、収量が大幅に低下する。穂ばらみ期の低温ストレスに対する強度耐冷性遺伝子が単離できれば、イネの耐冷性向上による安定的な生産を確保することが可能になると考えられる。

本研究では大量個体の遺伝子型判定の効率化のため、簡易 PCR テンプレート調整法を開発し、簡易 DNA 多型判定法の低コスト高効率化を実現させた(第1章)。これらの手法を用いることで、イネの核型雄性不稔性原因遺伝子の推定(第2章)と「麗江新団黒谷」の有する強度耐冷性の QTL 解析および候補領域の絞り込みを行った(第2章第2節)。

## 第1章 高効率で簡易な SNP 検出のための技術改良

### 第1節 リーフパンチ法による大量サンプルからの PCR テンプレートの簡易調整法の開発

これまでに様々な簡易 DNA 抽出法が提案されてきたが、サンプルの破碎や遠心分離の過程を必要とするなど、大量サンプルを扱う場合に大きな労力がかかる。ミニコルクボーラーを用いて小さな葉片を切り取り、直接 PCR のテンプレートとして用いることにより、特別な試薬等を加えることなく DNA の増幅を行うことが可能であることが分かり、リーフパンチ法と名付けた。

イネの葉を材料として、様々なサイズの DNA 断片を生じるプライマー対を用いて PCR を行ったら、100-300bp 程度の短い断片の場合に最も増幅効率が高かった(Table 1)。組織の成熟度に関わらず、生の葉および凍結した葉の何れからも同様の高い効率で DNA を増幅することができた(Table 2)。用いる葉片のサイズは直径 1-1.5mm の場合に最も効率が高かった(Table 3)。8 種類のプライ

マー対を混合するマルチプレックス PCR を行ったところ、増幅効率はプライマーの配列に大きく依存するが、マーカーによっては可能であった (Table 4, Figure 1)。シロイヌナズナなどの他の植物に用いた場合においても DNA 増幅を確認できた (Table 5)。リーフパンチ法を用いることで、DNA 抽出の過程を完全に省略することが可能になった。

## 第 2 節 高効率低コスト遺伝子型判定のためのドットブロット SNP 法の改良

### 第 1 項 ドットブロット SNP 法のプローブ標識法の改良

Dot-blot-SNP 法は SNP を他の手法に比べて安価に労力をかけず分析することができる手法であるが、各マーカーの SNP を含む領域の配列に対して特異的な DIG 標識プローブを合成する必要がある、コストがかかる。プローブの DIG 標識を PCR により行う方法 (Figure 2a)、および共通の DIG 標識プローブ配列に対する相補的な配列を連続して有する無標識のオリゴヌクレオチドを合成し、これを共通の DIG 標識プローブと混合して二重のハイブリダイゼーションを行う方法 (ブリッジハイブリダイゼーション法) (Figure 2b) を考案し、検出感度の検討を行った。また、Dot-blot-SNP 法のさらなる効率化を目指し、複数のマーカーのプライマーを混合してマルチプレックス PCR を行う方法と、PCR は個別に行い複数のプローブを混合して一度に検出する方法を検討した。

イネ品種間のある SNP に特異的な配列を用いて、従来通り 5'-DIG 標識あるいはビオチン標識を行ったプローブ、PCR により DIG 標識を行ったプローブ、およびブリッジプローブを用いて検出感度を比較したところ、5'-DIG 標識プローブに比べて感度は落ちるものの、すべてのプローブで品種特異的なシグナルを検出することができた (Figure 3)。日本型水稻 17 品種を識別することが可能な 7 個の SNP マーカーについてマルチプレックス PCR を行った場合も (Figure 4)、PCR はマーカー別に行い 7 マーカーの混合プローブをハイブリダイゼーションさせた場合も (Figure 5)、約半数のマーカーで品種特異的なシグナルを検出することができた。ブリッジハイブリダイゼーションおよび混合プローブによる検出を組み合わせることで、Dot-blot-SNP 法をさらに安価かつ効率的に行うことが可能となった。

### 第 2 項 特異的シグナル検出条件の効率的予測法の開発

Dot-blot-SNP 法は一塩基の差異を確実に検出するために 17 塩基程度の短い



オリゴヌクレオチドプローブを用いており、マーカーごとにハイブリダイゼーションと洗浄時における最適な温度および塩濃度条件が大きく異なる。各プローブの最適検出条件を予測することを可能にするため、DINAMelt web serverを用いてプローブ配列から計算した  $T_m$  値と、実測した  $T_m$  値、および特異的なシグナルを検出できた最適条件を比較した。

計算した  $T_m$  値と実測した  $T_m$  値を比較すると、多くのプローブが  $3^{\circ}\text{C}$  以内の差であった(Figure 6a, b)。完全に相補的な DNA 断片間の結合によりシグナルが検出される条件のうち、最適検出条件と計算  $T_m$  値との差は平均  $14.4^{\circ}\text{C}$ (Figure 6c)、実測  $T_m$  値との差は平均  $15.2^{\circ}\text{C}$  であった(Figure 6d)。一塩基のミスマッチを含む DNA 断片間の結合によって非特異的なシグナルが検出された温度と  $T_m$  値の差異も同様に約  $14^{\circ}\text{C}$  であった(Figure 6e, f)。シグナルの最適検出温度( $T_{\text{Hyb}}$ )と計算  $T_m$  値の関係式は  $T_{\text{Hyb}}=T_m-14.4$ 、実測  $T_m$  値との関係式は  $T_{\text{Hyb}}=T_m-15.2$  で表す事ができた。回帰式に対する標準誤差は両者に差がなく、計算  $T_m$  値を用いて最適検出温度を予測することが可能であると考えられた。0.1, 0.2, 0.5 および  $1 \times \text{SSC}$  の 4 段階の塩濃度の SSC バッファーを洗浄時に用いたところ、塩濃度が一段階高くなれば、特異的なシグナル検出温度は  $5^{\circ}\text{C}$  程度ずつ下がることがわかった。競合型オリゴヌクレオチドプローブを加えることで非特異的なハイブリダイゼーションが阻害され特異性が上がるが、この効果の程度について検討したところ、加えない場合に比べて約 1.8 倍特異的なシグナルを検出できる条件が増加した(Figure 7)。新しく設計したプローブについて、計算式から最適シグナル検出条件を予測する事が可能になり、条件検討の労力を削減することが可能になった。

## 第 2 章 イネの雄性生殖器官の発達および低温ストレス耐性機構に関する遺伝子の解析

### 第 1 節 核型雄性不稔性原因遺伝子の推定

雄性不稔性は一代雑種育種に有用な形質であるが、核型雄性不稔性はこれまでのところあまり利用されていない。核型雄性不稔性を利用する場合は、維持系統が不必要であるが、不稔系統をヘテロ個体で維持しなければならず、不稔個体をマーカー選抜などにより効率的に選抜する方法が不可欠である。

「コシヒカリ」のガンマ線照射突然変異系統である「C204」は、一遺伝子劣性の突然変異系統であり、完全不稔を示す(Figure 8)。「C204」の雄性不稔性に

ついて、「アキヒカリ」との F<sub>2</sub> 集団 96 個体を用いて 44 個の SNP マーカーとの連鎖解析を行った結果、原因遺伝子は第 9 染色体長腕に座乗することがわかった(Figure 9)。第 9 染色体の一部のみが「Kasalath」由来である染色体部分置換系統 CSSL228 と「C204」の交配後代集団 1792 個体を用いてファインマッピングを行ったところ、Os09g0493500 の第 1 エキソン中に一塩基の欠失が見つかり、フレームシフトが起こっていることが予想された(Figure 10)。Os09g0493500 は NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein に属しており、シロイヌナズナにおいて Os09g0493500 と最も相同性の高い遺伝子である Dihydroflavonol 4-reductase-like gene (DRL1)(At4g35420)は(Figure 11, 12)、この遺伝子が機能を失うと不稔になることが示されている。このことから、本研究で見いだした一塩基の欠失が「C204」が不稔を示す原因である可能性が極めて高いと考えられ、現在相補性試験等を進めている。Os09g0493500 は葉緑体、ミトコンドリア、分泌経路への局在が予測された。遺伝子発現解析を行ったところ、葉と茎、また四分子期から二核期にあたるステージの葯で発現しており、「コシヒカリ」と「C204」の間で発現に差は見られなかった(Figure 13)。見いだした一塩基欠失変異について Dot-blot-SNP マーカー化を行い、ヘテロ集団 1056 個体から劣性ホモ型個体を選抜し、花粉稔性および種子稔性の調査で雄性不稔を示すことを確認した。本研究で見いだした「コシヒカリ」の雄性不稔変異体と選抜マーカーは、一代雑種育種への適用が期待される。

## 第 2 節 穂ばらみ期低温ストレス耐性に関する QTL 解析

イネは穂ばらみ期に低温にさらされると雄性不稔になりやすく、収量が大幅に減少する。気候に左右されずイネを安定して生産するためには、穂ばらみ期耐冷性を強化したイネ品種を育種していくことが必要である。「羽系 840」は、日本における強度耐冷性品種である「ひとめぼれ」と、「ひとめぼれ」を上回る強度耐冷性を有する中国の在来種「麗江新団黒谷」の交配後代であり、「ひとめぼれ」以上の強度耐冷性を有する(Figure 14)。「麗江新団黒谷」と「ひとめぼれ」間の多型を検出できる 245 の DNA マーカーを用いて「羽系 840」のグラフ遺伝子型解析を行い、55 マーカーで「ひとめぼれ」との多型を検出した(Figure 15)。

「羽系 840」と「ひとめぼれ」の F<sub>2</sub> 集団を 6 月末から 9 月上旬までの約 2 ヶ月間、水深 20cm、水温 18.5℃の条件で栽培し、種子稔性を調査した。F<sub>2</sub> 集団 192 個体を用いて QTL 解析を行ったところ、第 3 染色体長腕に寄与率 24.4%、相加

効果 14%の QTL を検出した(Figure 16, Table 6)。第 3 染色体以外の領域を「ひとめぼれ」型に置換した準同質遺伝子系統を作成し、この系統と「ひとめぼれ」との F<sub>2</sub> 集団 192 個体を用いて再度 QTL 解析を行ったところ、寄与率 18.1%、相加効果 13%の QTL を検出した(Figure 17, Table 7)。QTL 検出領域内で組換えが起こった系統を 10 系統選抜し、低温処理後の種子稔性を調査し、強度耐冷性の候補領域を SSR マーカー RM3719 と RM7000 の間の約 1.2Mb の範囲に絞り込むことができた(Figure 18)。この領域には 143 の遺伝子が予測されている。この領域について「羽系 840」の塩基配列を決定し、「ひとめぼれ」との多型を調べることで、候補遺伝子を推定できると期待される。

## 結語

リーフパンチ法による PCR テンプレートの簡易調整および Dot-blot-SNP 分析の低コスト化および高効率化を可能にした。これらの手法はマーカー選抜や遺伝子のファインマッピングなど、大量サンプルの DNA 多型を判定する際に有用であると考えられる。実際にこれらの手法を用いて、核型雄性不稔変異体「C204」の原因遺伝子を Os09g0493500 であると推定した。また、雄性生殖器官の形成時における低温ストレス耐性について、強度耐冷性を示す「麗江新団黒谷」由来の耐冷性 QTL 領域を 1.2Mb の領域に絞り込むことができた。

Table 1. Amplification efficiency of different-sized DNA fragments from rice leaf disks

Markers	PCR product size (bp)									
	100		200		300		500		1000	
	T*	A*	T	A	T	A	T	A	T	A
1	14	14	14	14	14	14	14	14	14	0
2	14	14	14	14	14	14	14	12	14	2
3	14	14	14	14	14	14	14	13	14	0
4	14	14	14	14	14	14	14	9	14	7
5	14	14	14	14	14	14	14	9	14	7
6	14	13	14	13	14	14	14	2	14	8
7	14	13	14	14	14	14	14	3	14	0
8	14	14	14	11	14	14	14	0	14	0
9	14	14	14	14	14	14	14	0	14	0
Total	126	124	126	122	126	126	126	62	126	31
Amplification efficiency(%)	98.4		96.8		100		49.2		24.6	

\* T, tested; A, amplified.

Table 3. Efficiency of DNA amplification from different sized leaf disks in different volumes of PCR mixture

Leaf size(mm)	PCR mixture volume (μl)					
	10		20		50	
	T	A	T	A	T	A
1.0	12	12	12	12	12	11
1.5	12	12	12	11	12	12
2.0	12	0	12	11	12	12

T, tested; A, amplified.

Table 2. Efficiency of DNA amplification from fresh, frozen, and dried leaves of young and mature rice plants

Leaf samples	PCR product size (bp)																		Total	
	100						200						300							
	Marker1		Marker2		Marker3		Marker4		Marker5		Marker6		Marker7		Marker8		Marker9			
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A		
Fresh leaves of young plants	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	108	108
Fresh leaves of mature plants	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	108	108
Freezed leaves from mature plants	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	108	108
Dried leaves from mature plants	12	4	12	4	12	7	12	10	12	11	12	8	12	8	12	8	12	7	108	67

T, tested; A, amplified.

Table 4. Efficiency of DNA amplification by multiplex PCR using leaf disks as templates

No. of mixed primers	Marker1		Marker2		Marker3		Marker4		Marker5		Marker6		Marker7		Marker8		Total		Amplification efficiency(%)
	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	
Single primer	20	19	20	19	20	18	20	16	20	14	20	17	20	20	20	20	160	143	89.4
4 primer pairs	20	0	20	19	20	12	20	0	20	16	20	19	20	20	20	20	160	106	66.3
8 primer pairs	20	0	20	12	20	10	20	0	20	16	20	19	20	20	20	17	160	94	58.8

Multiplex PCR with 4 primer pairs contained primers for Marker 1-4 or those for Marker 5-8, and that with 8 primer pairs contained all of them.

T, tested; A, amplified.

Table 5. Efficiency of DNA amplification from leaf disks of various plant species

Species name	Marker1				Marker2			
	rTaq		KOD		rTaq		KOD	
	T	A	T	A	T	A	T	A
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4	4	-	-	4	4	-	-
<i>Brassica rapa</i>	4	4	-	-	4	4	-	-
<i>Lotus japonicus</i>	4	4	-	-	4	4	-	-
wheat	12	11	-	-	12	12	-	-
melon	12	12	-	-	12	12	-	-
tomato	12	0	12	9	12	0	12	0
soybean	12	0	12	9	12	0	12	0

T, tested, A, amplified, -, not tested

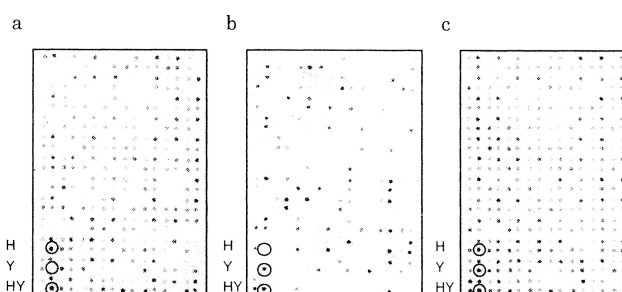
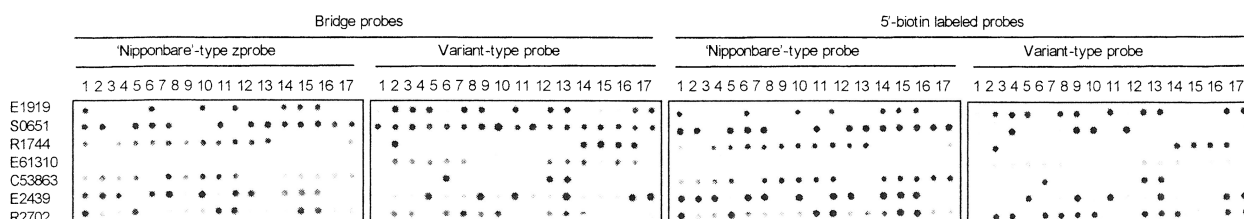
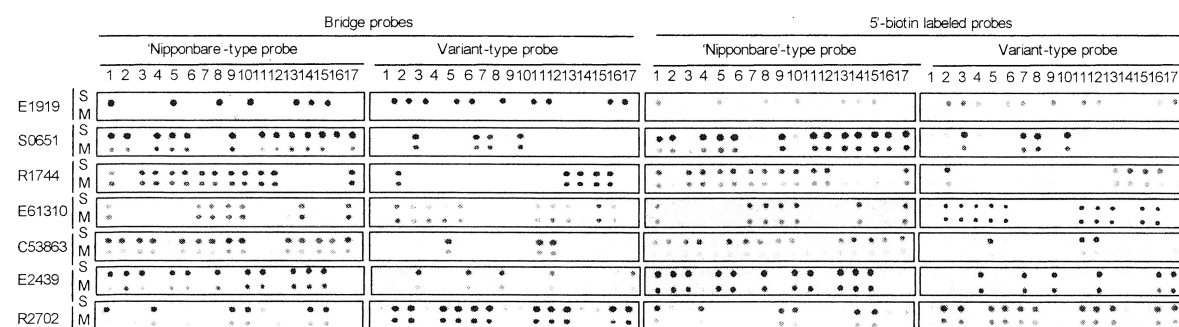
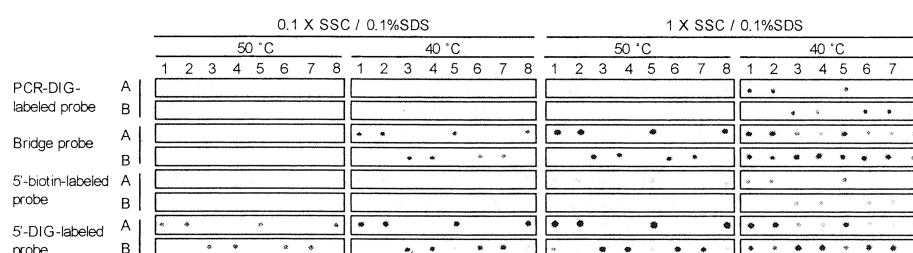
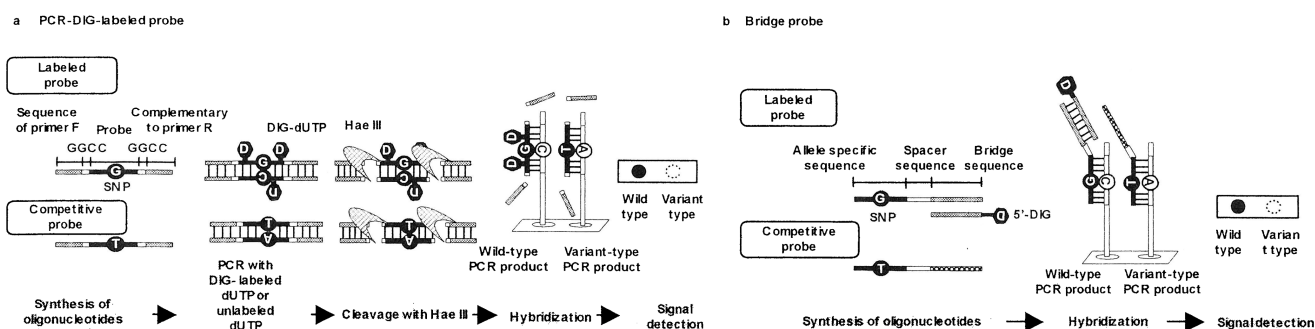


Figure 1. Genotyping of rice breeding lines using dot-blot-SNP analysis of DNAs amplified from leaf disks by PCR. The PCR products were dot-blotted onto three nylon membranes (a-c) and analyzed by a marker E20943. Signals were detected by a 'Hitomebore'-type probe (a), a 'Yumemusubi'-type probe (b), and a mixture of both the probes (c). H 'Hitomebore' DNA; Y 'Yumemusubi' DNA; and HY a DNA mixture of 'Hitomebore' and 'Yumemusubi'.



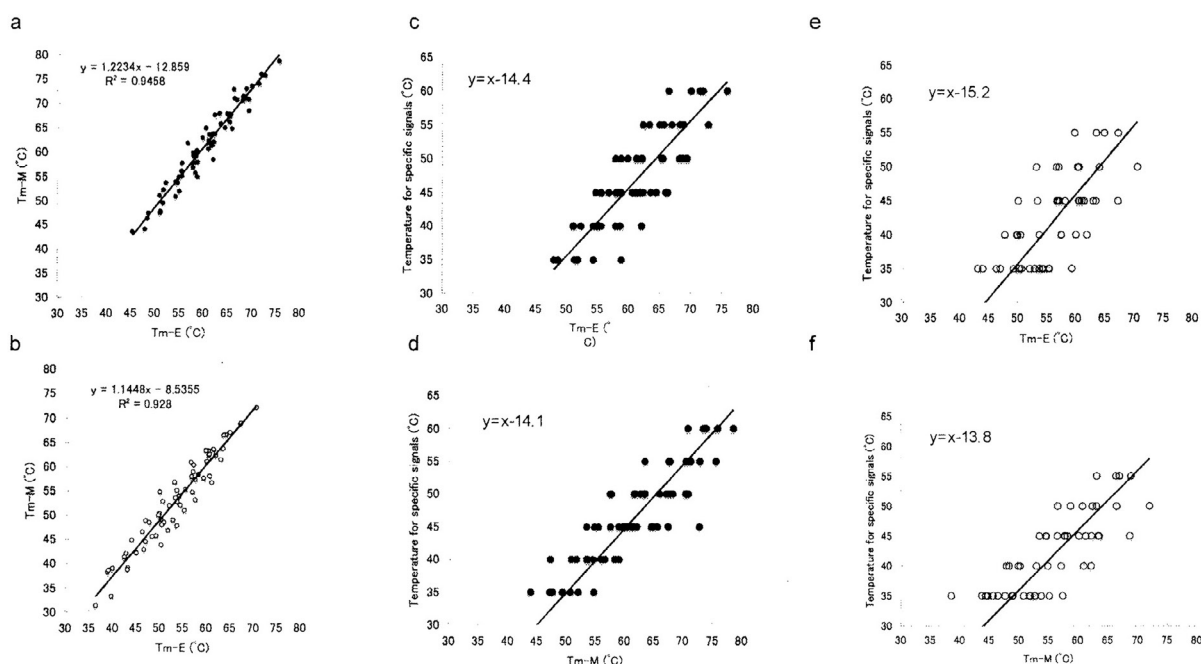


Figure 6. Relationships between estimated  $T_m$  values, measured  $T_m$  values, and temperatures for specific and non-specific signal detection. Relationship between estimated  $T_m$  values and measured  $T_m$  values of complementary oligonucleotides (a) and mismatching oligonucleotides (b). Relationship between estimated  $T_m$  values and temperatures for signal detection with complementary oligonucleotides (c) and mismatching oligonucleotides (d). Relationship between measured  $T_m$  values and temperatures for signal detection with complementary oligonucleotides (e) and mismatching oligonucleotides (f).

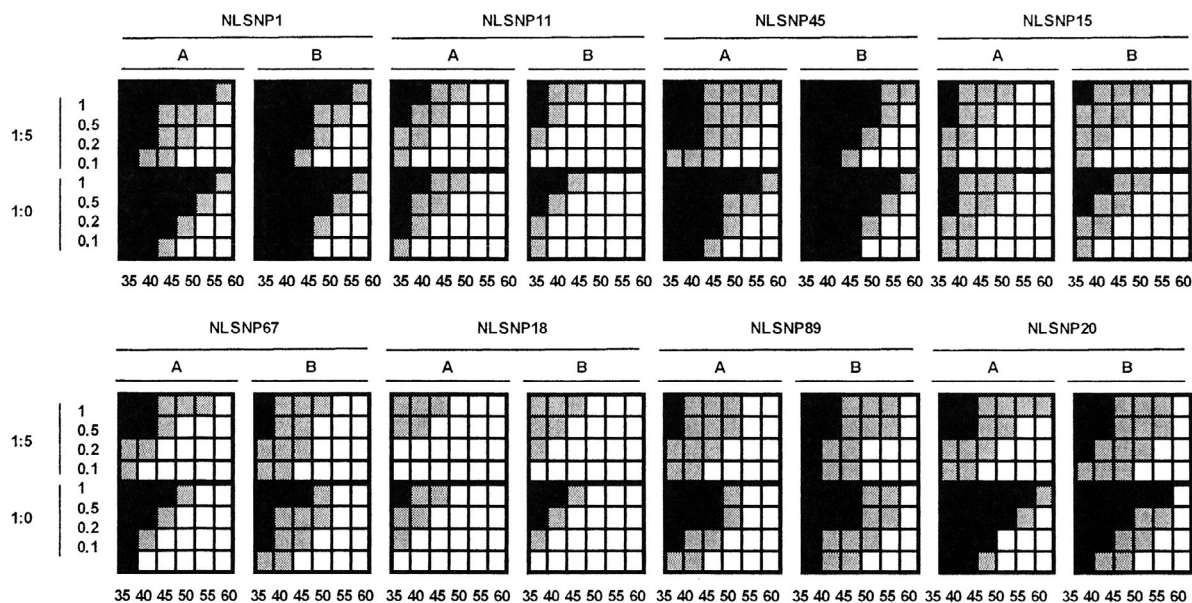


Figure 7. Effect of competitive hybridization on allele-specific signal detection. Probe oligonucleotides and their competitive oligonucleotides were mixed at 1:0 or 1:5. Each cell shows a result of signal detection using 0.1 x, 0.2 x, 0.5 x or 1 x SSC at 35, 40, 45, 50, 55, 60°C. White cells indicate no signals, gray cells indicate specific signal detections and black cells indicate non-specific signals.

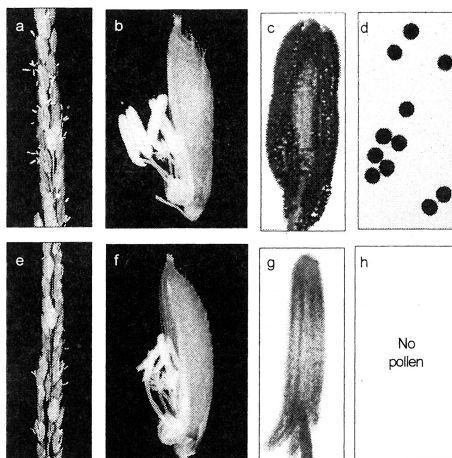


Figure 8. Comparison of phenotypes between 'Koshihikari' (wild type) and 'C204'. Panicles (a and e), anthers (b, c, f and g) and pollen grains (d and h) of 'Koshihikari' (a to d) and 'C204' (e to h). Anthers and pollen grains of c, d, g and h were investigated after staining with  $I_2/KI$  solution.

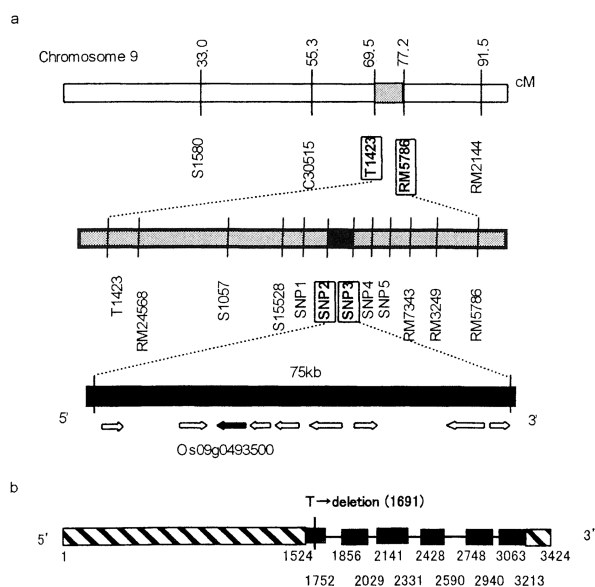


Figure 10. Fine mapping of the male sterility gene in 'C204'. A single-nucleotide deletion was identified in Os09g0493500 on the long arm of chromosome 9 (a). The structure of Os09g0493500 is shown (b). Black boxes indicate coding regions, hatched boxes indicate UTR regions and black bars indicate introns.

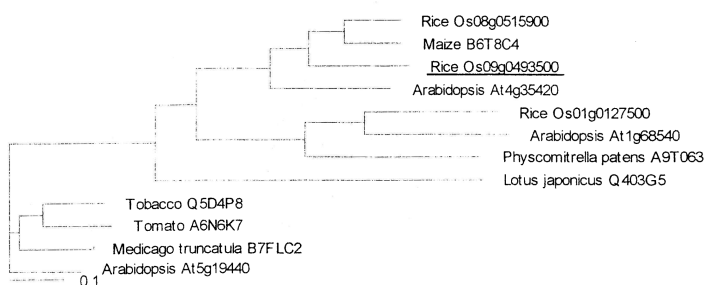


Figure 11. Phylogenetic analysis of Os09g0493500 by the neighbor joining method.

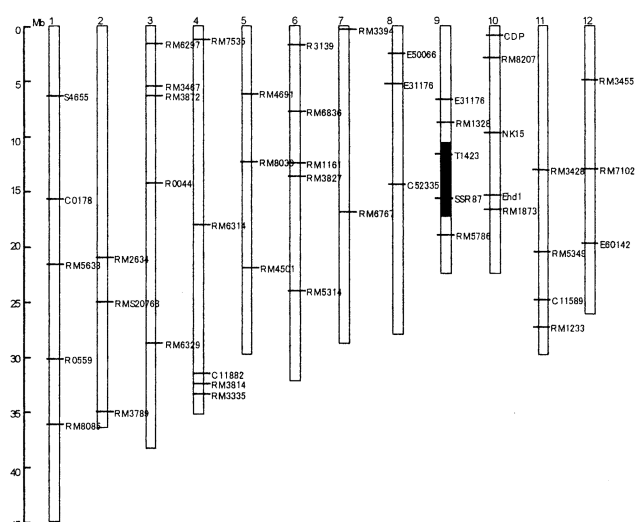


Figure 9. Position of a chromosomal region linked to male sterility of 'C204' (black bar). DNA markers used for rough mapping of the male-sterility gene are shown.

Os09g0493500	MYNISWSSSRIFLCCAYMSRLICFRVQHFFQFEKMWISSKGKVCVTGASGFVASWLK
At4g35420	-----MDQAKGKVCVTGASGFASWLK
	*****
Os09g0493500	RLLEAGYHVIGTVRDPNSNRDKVSHLWRLPSAKERLQLVRADLMEEGSDFAVMACEGVFH
At4g35420	RLLEGEYVIGTVRDPNGEKKLAHLWKLEGAKEKRLVKADLMEEGSDFAVMACEGVFH
	*****
Os09g0493500	TASPVLAQSDSNCKEEMLPVPAINGTLNLVSKCKNPFKRVVLTSSSTVTRIRDESKHPE
At4g35420	TASPVLKPT-SNPEEEILRPAIEGTLNLVRSCKNPSLKRVLTSSTSTVTRIRDD-FDPK
	*****
Os09g0493500	ISLDETIWSVALCEKLQWYALAKTSAEAAWEFAKENIDLTVLPSPFVIGPSLSHEL
At4g35420	IPLDESITWSVELCKRFQWYALSKTLAEQAQWKFSENGDVLTVLPSPFLVGPSPPLDL
	*****
Os09g0493500	SVTASDILGLLQGDTRFISYGRMGVYHIDDVASCHILVYEAPQATGRYLNSVVLDDNE
At4g35420	CSTASDVLGLLKGTEKFWHQMGVYHIDDVARTHIVFEHAAQGRYICSSNVISLEE
	*****
Os09g0493500	LVALAKQFPPIPIPRSLRNPYEQSYELNTSKIQQLGFKFGVQEMFDCVESLKDQGH
At4g35420	LVSFLSARYPSLPIPKRFEKLN-RLHYDFDTSKITQSLGKFKSLEEMFDDCIASLVEQGY
	** * * * *
Os09g0493500	LLECPL
At4g35420	LSTVLP
	*

Figure 12. Comparison of deduced amino acid sequences between Os09g0493500 and At4g35420. Asterisks indicate identical amino acid residues between Os09g0493500 and At4g35420. The black bar indicates the conserved domain of epimerase and the dotted line indicates the conserved domain of NAD-binding-4.

		Anther									
		Stem		Leaf		1		2		3	
		K	C	K	C	K	C	K	C	K	C
25 cycles	<i>Os09g0493500</i>										
	<i>Actin</i>										
30 cycles	<i>Os09g0493500</i>										
	<i>Actin</i>										
35 cycles	<i>Os09g0493500</i>										
	<i>Actin</i>										

Figure 13. RT-PCR analysis of Os09g0493500 in stems, leaves and anthers of 'Koshihikari' (K) and 'C204' (C). Anthers were taken from flowers of three developmental stages (1-3). '1' indicates a stage from tetrad to uninuclear stage, '2' indicates binuclear stage, and '3' indicates trinuclear stage. PCR cycles were 25, 30 and 35 times.





## 論文審査結果要旨

イネの冷害は、古くから東北農業において最も重要な解決すべき問題で、近年の温暖化のもとでも依然として数年に一度は発生し、イネの収量低下をもたらす。そのため、より冷害に強い品種の育成が求められている。本研究は、低温条件でも花粉不稔にならないイネ品種の高度耐冷性遺伝子を解明するため、高効率 SNP 分析技術の開発を行い、候補遺伝子を絞り込み、遺伝的花粉不稔の原因遺伝子の解明も行ったものである。

高効率 SNP 分析技術の開発では、まず、多数の植物個体からの PCR テンプレートの効率的調整法として、リーフパンチ法を開発した。植物の葉を特製のミニコルクボーラーを用いて径 1 mm で打ち抜き、PCR 反応液に直接入れることでドットブロット SNP 分析に利用可能な 100–300 bp の DNA の増幅が可能なことを明らかにした。ドットブロット SNP 分析法は多数個体の SNP 分析に適した方法であるが、SNP マーカーを多数作成するにはコストがかかる。この技術の低コスト化のため、プローブの標識法として、PCR でオリゴヌクレオチドを標識する方法と 2 種類のオリゴヌクレオチドを用いるブリッジ法を開発した。また、ドットブロット SNP 分析の分析条件をプローブオリゴヌクレオチドの塩基配列から予測する方法を開発した。

花粉不稔の突然変異遺伝子を同定するため、日本品種同士の交雑による  $F_2$  でラフマッピングを行い、その領域だけインディカ品種に置換した系統との  $F_2$  を用いて遺伝子のファインマッピングを行った。75 kb 領域内に突然変異遺伝子を絞り込み、その中にある全ての遺伝子のコード領域と上流領域の塩基配列を決定し、エキソン内に一塩基の欠失がある遺伝子を見出した。この遺伝子のシロイヌナズナ類似遺伝子の突然変異は雄性不稔となることが報告されていることから、この変異が花粉不稔の原因と推定した。

障害型冷害耐性が最強の中国品種の耐冷性遺伝子を同定するため、日本品種との交雑後代を用いて QTL 解析を行い、第 3 染色体に QTL を見出した。QTL 領域のみが中国品種由来であり、その他の領域が日本品種の染色体部分置換系統を作出し、その QTL 領域内で組換えが起こった系統を選抜して耐冷性を評価し、耐冷性遺伝子を 1.2 Mb の領域に絞り込んだ。その領域の塩基配列を決定し、候補遺伝子を推定した。

以上のように、本研究は、遺伝子の研究や遺伝子情報を利用した育種において有用な SNP マーカーの簡易低コスト分析法を開発し、その技術を利用して、イネの核遺伝子雄性不稔性の遺伝子を同定すると共に、耐冷性遺伝子の染色体領域を絞り込んだもので、農学における貢献が大きい。よって、審査員一同は本論文は博士（農学）の学位を授与するに値する内容であると判定した。